

研究報告書

「バイオ燃料高生産のための炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 蘆田 弘樹

1. 研究のねらい

近年、化石燃料の将来的な枯渇が大きく懸念されており、エネルギー問題が日々、大きく取り上げられている。次世代におけるエネルギー源確保のための世界動向は、化石燃料に頼らない次世代エネルギー生産へ、特に化石燃料から生物生産エネルギーへと大きな方向転換が行われようとしている。このためのアプローチの一つとして、シアノバクテリアや藻類を利用したバイオ燃料生産に期待が持たれている。これら光合成生物は、光をエネルギー源に、光合成で固定した炭素を直接原料としてバイオ燃料を生産することが可能である。食糧原料と競合しないこと、カーボンニュートラルな燃料生産が可能なることから、次世代エネルギー生産系として期待が持たれている。特に、シアノバクテリアは、生育が速く、高い光合成能力を有することから、バイオ燃料生産ホストとして大いに期待が寄せられている。実際、代謝工学により、バイオ燃料生産代謝を導入することにより、シアノバクテリアを用いた様々なバイオ燃料生産の成功が報告されている。しかしながら、シアノバクテリアを次世代バイオ燃料生産ホストとして確立するためには、さらにバイオ燃料生産性を高め、生産コストを下げるのが課題である。このためには、シアノバクテリアの光合成炭素固定能の強化が必須である。

RuBisCO はカルビンサイクルにおいて、リブロースビスリン酸に CO_2 を固定するカルボキシラーゼ反応を触媒する光合成炭素固定酵素である。しかし、RuBisCO は CO_2 固定反応を拮抗的に阻害する O_2 との反応性により生じるオキシゲナーゼ反応を触媒し、さらに CO_2 固定反応速度が非常に遅いといった、 CO_2 固定酵素として非効率な酵素特性を有する。これらが原因となり様々な局面において光合成を律速している。本さきがけ研究では、RuBisCO の機能発現機構・機能進化の解明を行い、その結果を基に RuBisCO の機能発現最適化を行うことで、シアノバクテリアの光合成炭素固定能力の強化を目指すことを目的とした。また、得られた成果をシアノバクテリアにおけるバイオ燃料生産増加へ応用することも目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

シアノバクテリアの RuBisCO は一般に、 CO_2 親和性が低く、高い O_2 反応性を示す。このような RuBisCO の酵素学的欠点を補い、RuBisCO の CO_2 固定反応を最適化するために、シアノバクテリアは細胞内小器官 carboxysome 内に高い CO_2 濃度環境を作り出し、この中で RuBisCO を機能させている。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 を用いて、carboxysome における RuBisCO の機能発現機構を解析した結果、carboxysome の形成と形態を RuBisCO が制御していることを明らかにした。さらに、RuBisCO 発現量を人為的に制御し、carboxysome の形態・形成を変化させるすることにより、シアノバクテリアの光合成速度を

増加・低下させるコントロールが可能であることを明らかにした。

本研究では、RuBisCO の進化に着目し、機能そのものを強化するための基礎研究も行った。RuBisCO 機能進化解析から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性シアノバクテリアのものと比較して熱安定性と CO₂ 親和性が高く、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。また、非光合成生物の RuBisCO ホモログと RuBisCO との比較解析から RuBisCO の機能発現機構を明らかにした。一方で、アーキアの RuBisCO ホモログは CO₂ 固定能を有し、カルビン回路の原型ともいえる、アーキア型新規 CO₂ 固定回路で機能していることを明らかにした。

上記の成果をシアノバクテリアのバイオ燃料生産能強化へ応用するための研究も行った。*S. elongatus* PCC7942 株に pyruvate decarboxylase (PDC) と alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子を導入した代謝改変エタノール生産株に、RuBisCO 機能強化を施し光合成速度を増加させることで、エタノール生産性を向上することに成功した。

(2) 詳細

シアノバクテリアは、RuBisCO の CO₂ 固定反応を最適化するために、carboxysome と呼ばれるタンパク質シェルから構成される CO₂ 濃縮細胞小器官を進化させている。無機炭素濃縮機構により carboxysome 内に高 CO₂ 環境を作りだし、この中で RuBisCO を機能させることで、ほとんど O₂ 阻害を受けずに CO₂ 固定を行うことができる。このことから、RuBisCO 機能発現と carboxysome 形成の間には、何らかの相互制御メカニズムがあると予想されるが、これまで明らかにされていなかった。そこで、carboxysome 内における RuBisCO の機能発現機構解明を目指し、RuBisCO 量を増加、または低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を作製し、解析した。興味深いことに、RuBisCO 量を2または10倍に増加、または RuBisCO 遺伝子をヘテロに破壊し RuBisCO 量を1/2に低下させた *Synechococcus elongatus* PCC7942 変異株を解析した結果、RuBisCO 量の増加に伴い carboxysome が肥大すること、また、RuBisCO 量低下により carboxysome が減少することが明らかになった。このことから、RuBisCO 合成と carboxysome の形成・形態の間に制御メカニズムが存在すること、さらに、RuBisCO 発現量が carboxysome の形成・形態を制御していることを明らかにした。RuBisCO 量低下株と RuBisCO 量が10倍と過剰に発現している株では生育遅延と光合成活性低下が観察された。これらのことから、RuBisCO が光合成の律速因子であること、また過剰に発現しカルボキシソーム外に局在した RuBisCO は最適に機能発現ができないことを示していた。一方で、RuBisCO 量が2倍に増加している発現株では光合成活性が高くなった。このことにより、シアノバクテリアの光合成の律速段階の一つが RuBisCO の CO₂ 固定反応であることが明らかになった。また、RuBisCO 量を制御することで、光合成能力をコントロールが可能であり、最適な量的強化により、光合成能を増加させることができることを明らかにした。

上記の結果より、RuBisCO の酵素特性そのものの改良もシアノバクテリア光合成能強化に有効であると予想された。CO₂ 固定能や O₂ 反応性などの酵素特性が RuBisCO の機能進化上で大きなバリエーションを示すことから、RuBisCO 機能改良のための方向性を探るため、機能進化に着目した研究を行った。その成果として、好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus elongatus* BP1 や地球上で最も高温に適応している *Synechococcus*

lividus に常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 や *Synechococcus sp.* PCC7002 のものと比較して、熱安定性が高く、約 3 倍高い CO₂ 親和性を示す RuBisCO を発見した。この結果から、好熱性シアノバクテリア RuBisCO が常温性のものと比較して、進化上、高い機能性を獲得していることを明らかにした。好熱性シアノバクテリアと常温性 RuBisCO を比較したところ、アミノ酸配列で 95% と非常に高い相同性を示した。このことから、好熱性と常温性 RuBisCO の比較により、数少ない置換されている残基に注目すれば、高機能性に関与する残基を同定できると期待され、実際、これら好熱性 RuBisCO で特異的に保存される残基、構造を見出した。その中でも、small subunit の C 末端 extension が特徴的であった。そこで、常温性 *Synechococcus elongatus* PCC7942 と好熱性 *Thermosynechococcus elongatus* BP1 RuBisCO の large subunit と small subunit をそれぞれ置換したキメラ RuBisCO の大腸菌発現系を構築し、解析を行った。その結果、好熱性シアノバクテリア RuBisCO の酵素特性決定には、small subunit が大きく関与していることが明らかになった。これらのことから、シアノバクテリア RuBisCO の高機能化には、small subunit に着目した分子育種が有効であると期待された。

また、RuBisCO が光合成以外でも機能するよう多様に進化していることに注目し、非光合成生物の RuBisCO ホモログの機能解析を行った。枯草菌の RuBisCO ホモログはメチオニン再生経路においてエノラーゼとして機能しており、この経路における機能、また RuBisCO とホモログの比較解析から、これまで RuBisCO のみを用いた解析からは明らかにすることができなかった光合成 RuBisCO の機能発現に必須な残基・構造を同定した。さらに、非光合成生物であり、生命の起源に近いとされるアーキアが有する RuBisCO ホモログは、どのような分子進化の末に今もなお RuBisCO が効率の悪い CO₂ 固定酵素であるのかを解析する好材料である。解析の結果、アーキアの RuBisCO ホモログは RuBisCO であった。しかしながら、一般的にアーキアは光合成生物の RuBisCO が機能する CO₂ 固定のためのカルビンサイクルを有しておらず、RuBisCO の基質リブローズビスリン酸をリブローズ-5-リン酸から合成するホスホリブロキナーゼ (PRK) を欠失している。本研究により、一部のメタン菌において、アーキア型 PRK を同定した。これらの結果から、アーキアにおいて光合成カルビンサイクル様の RuBisCO と PRK が機能する新規 CO₂ 固定経路の存在が示唆された。アーキアが光合成生物よりも前に出現してきた生物であると考えられていることから、このアーキアの経路がカルビンサイクルの原始経路で、ここで機能する RuBisCO が光合成 RuBisCO の進化的原型であると予想された。RuBisCO の反応生成物解析から、このアーキア RuBisCO の O₂ 反応性が非常に高かったことから、分子進化初期から RuBisCO の O₂ 反応性が既に獲得されていたことが示唆された。

上記の研究成果をシアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産に応用するために、まず、バイオエタノール生産系の確立を行った。これまでの報告を参考に、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 にアルコール発酵菌である *Zymomonas* 由来の pyruvate decarboxylase と NADH 依存型 alcohol dehydrogenase 遺伝子を導入し、培地中にエタノール生産代謝導入株を出発株とし、エタノール生産系の検討・改良を行った。この株を用いた系では、培地中に生産されたエタノールが蓄積することから、回収が容易である利点がある。改良・最適化の結果、光合成で直接合成される NADPH を補酵素に用いる alcohol dehydrogenase を利用することで、エタノール生産量が最適化前の 3~4 倍に増加した。また、

最適に RuBisCO の量的強化を施し光合成能が向上した株を用いてエタノール生産することで、強化前と比較して、エタノール生産量を 1.2 倍に増加させることに成功した。この株では、1 L の培地あたり、2 g 以上のエタノール生産が可能であった。この結果は、RuBisCO 機能強化が、シアノバクテリアにおいてバイオ燃料生産量を増加させる一つの方向性であることを示していた。

3. 今後の展開

エタノール生産代謝導入シアノバクテリアの光合成およびエタノール生産量解析から、光合成で固定した炭素の実に 60%がエタノール合成に利用されていた。このため、シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産を制限する大きな要因の1つは、光合成炭素固定であると結論される。シアノバクテリアのバイオ燃料生産効率を大きく向上させるためには、光合成炭素固定能そのものを強化するブレークスルーが必須である。

本さがけ研究において、シアノバクテリアにおける、RuBisCO による carboxysome 形態・形成制御機構の存在が明らかになったことから、RuBisCO-carboxysome CO₂ 固定複合体形成の人為的制御が可能となった。実際、RuBisCO 量による CO₂ 固定複合体形成制御を介して光合成能を向上させ、バイオエタノール生産量増加に成功した。また、好熱性シアノバクテリアや非光合成 RuBisCO の機能解析の結果から、RuBisCO の機能改良ターゲットとなる構造・残基の同定が可能となった。これらにより、RuBisCO そのものの機能改良または CO₂ 固定複合体としての機能強化の新しい方向性が開けた。

今後は、これら両方向からの RuBisCO 機能発現最適化を行うことで、シアノバクテリアの光合成炭素固定能強化を行い、バイオ燃料高生産可能なシアノバクテリアの創成を目指す。更に RuBisCO を中心とした光合成炭素固定機構が明らかになることで、光合成能の根本的な改良が可能となり、シアノバクテリアで確立されてきている様々なバイオ燃料の生産能増加が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO に注目して、この酵素の機能発現最適化によるシアノバクテリアの光合成能強化ならびにこれを利用したバイオ燃料高生産化は、研究のねらい通り、達成できたと考えている。また、将来的な、更なる RuBisCO 機能強化のための材料や方向性も、準備できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。

光合成炭素固定酵素ルビスコとCO₂濃縮細胞小器官カルボキシソームの量的強化を行い、エタノールの高生産を目指す研究を行っている。外来性優良ルビスコ過剰発現による炭素固定能を強化したスーパーシアノバクテリアの創成に向けた独創的な研究で発展性が期待される。また、論文等の業績などは満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果た

したと評価する。今後は、CREST との融合研究を通じて、新たな知見を獲得すると共に、更なる進展を期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kang W, Hong SH, Lee HM, Kim NY, Lim YC, Le LT, Lim B, Kim HC, Kim TY, Ashida H, Yokota A, Hah SS, Chun KH, Jung YK, Yang JK. Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 2014, 111, E54-E61, doi: 10.1073/pnas.1308768111.
2. Nakano T, Ohki I, Yokota A and Ashida H. MtnBD is a Multifunctional Fusion Enzyme in the Methionine Salvage Pathway of Tetrahymena thermophila. PLoS One, 2013, 8, e67385. doi: 10.1371/journal.pone.0067385.
3. Nakano T, Saito Y, Yokota A and Ashida H. Plausible novel ribose metabolism catalyzed by enzymes of the methionine salvage pathway in Bacillus subtilis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77, 1104-1107.
4. Nakano T, Saito Y, Yokota A, Ashida H. His267 is involved in carbamylation and catalysis of RuBisCO-like protein from Bacillus subtilis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 431, 176-80.
5. Ashida H and Yokota A. Increasing photosynthesis/RuBisCO and CO₂ concentrating mechanisms. Comprehensive Biotechnology, 2011, 4, 165-176.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 蘆田弘樹、RuBisCO 機能進化研究 ~RuBisCO-like protein の解析を通して、日本光合成学会若手の会第4回セミナー 2011年6月
2. 蘆田弘樹、メチオニン欠乏環境で機能する枯草菌メチオニン再生経路酵素 RuBisCO-like protein と光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の比較研究 第84回 日本生化学会大会 シンポジウム 2011年9月
3. Hiroki Ashida, Perspectives of research on increasing photosynthesis in cyanobacteria by overcoming the limitations of CO₂-fixing enzyme, RuBisCO. 日本化学会第92春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム 2012年3月
4. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン産生アーキア Methanospirillum hungatei における RuBisCO と PRK を利用した新規 CO₂ 固定回路の解析 日本農芸化学会 2012年度大会 2012年3月
5. 河野卓成、遠藤千夏子、Mehrotora Sandhya、横田明穂、蘆田弘樹 メタン菌における Pre-Calvin cycle の解析 日本 Archaea 研究会 第25回講演会 2012年7月

6. Hiroki Ashida, Evolutional and functional diversity of RuBisCO and RuBisCO-like proteins. Japanese-Finnish Seminar 2012, Sep. 2012
7. 蘆田弘樹、食糧問題解決に期待される光合成微生物の CO₂ 固定酵素ルビスコが持つポテンシャル 日本化学会第93回春季年会 (2013)、アドバンス・テクノロジー・プログラム 2013年3月
8. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
9. 蘆田弘樹、向川佳子、小林知佑、横田明穂 シアノバクテリアを用いたエタノール生産のための代謝改変 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月
10. 河野卓成、遠藤千夏子、横田明穂、蘆田弘樹 アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素 phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析 日本 Archaea 研究会 第26回講演会 2014年7月
11. 蘆田弘樹 光合成 CO₂ 固定酵素ルビスコの基礎研究とその成果を用いた応用研究 東京大学生産技術研究所第1回応用化学セミナー 2014年7月
12. Takunari Kohno, Chikako Endo, Akiho Yokota and Hiroki Ashida. Enzymatic analysis of archaeal homologues of phosphoribulokinase, a key enzyme in the photosynthetic Calvin cycle. 30th of the Gordon conference of Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology. July 2014
13. 蘆田弘樹 ラン藻を用いたエタノール高生産を目指したルビスコ機能強化研究 第4回藻類バイオ燃料生産技術研究会 2014年9月
14. 蘆田弘樹 光合成 CO₂ 固定酵素ルビスコの機能進化を探る 第27回インターゲノミクスセミナー 2014年12月
15. 蘆田弘樹、向川佳子、横田明穂 シアノバクテリアにおける RuBisCO 発現量によるカルボキシソーム形成制御機構 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月
16. 河野卓成、遠藤千夏子、木津奈津子、木村浩之、溝端栄一、井上豪、松村浩由、横田明穂、蘆田弘樹アーキア型 phosphoribulokinase の機能解析 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月

著作物

1. 蘆田弘樹 シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産技術の開発 藻類オイル 開発研究の最前線、株式会社エヌ・ティー・エス、2013年、pp149-161
2. シアノバクテリアの光合成能を利用したバイオ燃料生産 生物工学会誌、2013年、91巻、6号、pp352